

Aplicação do IMER-GAPDH-Tc na triagem de potenciais agentes anti-tripanosômicos

Marcela C. de Moraes^{1*} (PG), Carmen L. Cardoso² (PQ), Adriano D. Andricopulo³ (PQ), Glaucius Oliva³ (PQ), Quezia B. Cass¹ (PQ).

1. Departamento de Química, UFSCar, São Carlos-SP. 2. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto-SP. 3. Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, CBME, IFSC, USP, São Carlos-SP. E-mail: mcmmarcela@hotmail.com

Palavras Chave: GAPDH, Doença de Chagas, *T. cruzi*, IMER, inibidores, enzimas.

Introdução

O desenvolvimento e caracterização de biorreatores ou IMERs como ferramentas de pesquisa no âmbito da química médica constituem uma alternativa útil ao desenvolvimento racional de fármacos. Eles viabilizam uma economia de tempo, aumento da estabilidade, uso de pequena quantidade e reutilização da enzima. Os biorreatores podem ser utilizados na triagem de alta eficiência *on-line* em um sistema de cromatografia líquida (CL) permitindo a rápida identificação de inibidores específicos.¹

Considerando a importância da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase no ciclo de vida do *T. cruzi*, esta se tornou um importante alvo para o desenvolvimento de novos agentes antitripanossômicos, pois sua inibição impediria o parasita de obter a energia necessária para sua sobrevivência. Biorreatores contendo GAPDH de *T. cruzi* e humana desenvolvidos em nosso grupo foram utilizados em um sistema de cromatografia líquida,^{2,3} com objetivo de identificar inibidores específicos entre diferentes compostos.

Resultados e Discussão

Os biorreatores de GAPDH desenvolvidos foram avaliados quanto a capacidade de discriminar inibidores comparando os resultados com aqueles obtidos nos ensaios em solução. Inicialmente, seis diferentes compostos (Figura 1) foram ensaiados em ambos os formatos. A atividade da enzima foi monitorada pela produção de NADH medido espectrofotometricamente a 340nm em métodos previamente desenvolvidos.²⁻⁴

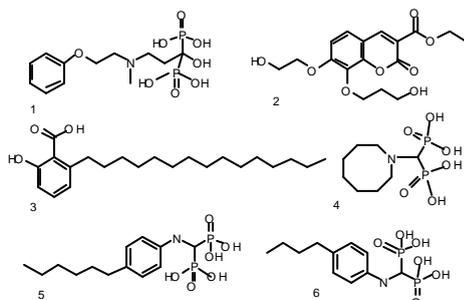


Figura 1. Série de compostos avaliados com a enzima GAPDH.

O método utilizando os biorreatores baseia-se na cromatografia seletiva de afinidade, e a quantificação do NADH foi feita por cromatografia líquida multidimensional, uma vez que o biorreator não apresenta resolução cromatográfica adequada.²⁻³

Tabela 1. Valores da porcentagem de inibição obtida para a série de compostos considerada, com a enzima GAPDH-Tc livre e imobilizada.

Composto	% de inibição	
	livre	imobilizada
1	50	45
2	MB	MB
3	90	75
4	MB	MB
5	MB	MB
6	MB	MB

* MB: muito baixa (<10%)

Os compostos 1 e 3 que mostraram significativa atividade inibitória nos ensaios com a GAPDH-Tc (Tabela 1) também foram avaliados no biorreator com a enzima GAPDH humana. Neste ensaio, esses compostos não mostraram atividade inibitória. Este resultado indica tratar-se de compostos inibidores seletivos da GAPDH de *T. cruzi*.

Conclusões

Os valores de inibição obtidos nos ensaios com o biorreator e em solução indicam que após imobilização a enzima reteve a atividade catalítica e a capacidade de reconhecer inibidores. Tais resultados validam o uso do biorreator na triagem de novos agentes antitripanossômicos específicos.

Agradecimentos

À FAPESP, CNPq e Capes pelos auxílios e bolsas concedidas.

¹ Wainer, I.W. et. al. *J. of Chromatog B* **1999** 724, 65-72.

² Cardoso, C.L, et, al. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1120, 151-157.

³ Cardoso, C.L, et, al. *Analyst* **2008**, 133, 93-99.

⁴ Kaliszán, R. *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*, Wiley, New York, **1987**.